

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C11B 1/10, C11C 1/00 A23L 1/337		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/25644 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Dezember 1993 (23.12.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/01334		(74) Anwälte: KÖSTER, H. usw. ; Jaeger, Lorenz & Köster, Pippinplatz 4a, Postfach 1620, D-8035 Gauting b. München (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Mai 1993 (27.05.93)		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: P 42 19 360.5 12. Juni 1992 (12.06.92) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MILUPA AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Bahnstraße 14-30, D-6382 Friedrichsdorf (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOHN, Gerhard [DE/DE]; Philipp-Franz-Str. 12, D-6501 Nieder-Olm (DE). SAWATZKI, Günther [DE/DE]; Ricarda-Huch-Str. 13, D-6309 Münzenberg (DE). ERBE, Jürgen [DE/DE]; Paracelsiusstr. 57, D-7000 Stuttgart (DE). SCHWEIKHARDT, Friedrich [DE/DE]; Falkenweg 1, D-6382 Friedrichsdorf (DE).			

(54) Title: PROCESS FOR EXTRACTING LIPIDS WITH A HIGH PROPORTION OF LONG CHAIN, HIGHLY UNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON LIPIDEN MIT EINEM HOHEN ANTEIL VON LANGKETTIG-HOCHUNGSÄTTIGTEN FETTSÄUREN

(57) Abstract

A process is disclosed for extracting lipids with a high proportion of long chain, highly unsaturated fatty acids (LCP) with 20 to 22 C atoms from a raw material of animal or vegetable origin. Monocellular algae (microalgae), macroalgae from the family of the brown, red and green algae and/or residues from the alginate or carragheenin extraction with a water content equal to or less than 50 % wt. and a grain size equal to or less than 50 mm are used. For the extraction an organic solvent or a condensed gas are used. Also prepared is a lipid extract having a high proportion of w6-LCP and w3-LCP, in particular a content of at least 5 % by weight arachidonic acid and/or at least 3 % by weight docosahexaenoic acid.

(57) Zusammenfassung

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Gewinnung von Lipiden mit einem hohen Anteil von langkettig-hochungesättigten Fettsäuren (LCP) mit 20 bis 22 C-Atomen durch Extraktion aus einem Rohmaterial tierischen oder pflanzlichen Ursprungs setzt man als Rohmaterial einzellige Algen (Mikroalgen), Makroalgen aus den Familien der Braun-, Rot- und Grünalgen und/oder Reststoffe der Alginat- bzw. Carragenangewinnung mit einem Wassergehalt ≤ 50 Gew.-% und einer Korngröße ≤ 50 mm ein. Zur Extraktion verwendet man ein organisches Lösungsmittel oder ein verdichtetes Gas. Bereitgestellt wird auch ein Lipidextrakt mit einem hohen Anteil an w6-LCP und w3-LCP und insbesondere mit einem Gehalt von mindestens 5 Gew.-% Arachidonsäure und/oder einem Gehalt an Docosahexaensäure von mindestens 3 Gew.-%.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	PR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	CA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CC	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monteiro	TC	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

"Verfahren zur Gewinnung von Lipiden mit einem hohen Anteil von langkettig-hochungesättigten Fettsäuren"

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Lipiden mit einem hohen Anteil von langkettig-hochungesättigten Fettsäuren mit 20 bis 22 C-Atomen durch Extraktion aus einem Rohmaterial tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, den dabei gewonnenen Extrakt und dessen Verwendung.

Neben den gesättigten Fettsäuren finden sich in unseren Lebensmitteln einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die somit in ihrer Kohlenstoffkette mindestens eine Doppelbindung aufweisen. Zur Bezeichnung dieser Polyenfettsäuren werden häufig Kurzformeln verwendet. Dabei wird zunächst die Anzahl der C-Atome bzw. die Kettenlänge angegeben. Es folgt ein Bindestrich oder Doppelpunkt, an die sich eine Zahl anschließt, welche die Anzahl der Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette bezeichnet. Im Anschluß daran, jedoch getrennt davon, wird die Zahl der Omega-C-Atome, gezählt vom Methylenende der Kette, nach einem "w" oder "n" angegeben. Dementsprechend wird die Linolsäure als 18-2 n6 bezeichnet.

Im Fettsäurestoffwechsel des Menschen können zwar Doppelbindungen in die Kohlenstoffkette einer gesättigten Fettsäure eingeführt werden. Diese Desaturierung ist allerdings nur ab dem Kohlenstoffatom C9 in Richtung auf das Carboxylenende möglich. Dies hat zur Folge, daß Fettsäuren, wie die Linolsäure (18:2 n6) und die α -Linolensäure (18:3 n3) als essentiell zu bezeichnen sind, da sie vom menschlichen Organismus nicht selbst synthetisiert werden können, sondern mit der Nahrung zugeführt werden müssen.

Ausgehend von diesen essentiellen C18-Fettsäuren ist der gesunde menschliche Organismus in der Lage, eine Reihe von hochungesättigten Fettsäuren mit 20 bzw. 22 C-Atomen durch weitere Desaturation und Kettenelongation zu synthetisieren.

- 5 Dabei erfolgt die Elongation am Carboxylenende des Moleküls und die Desaturation zwischen der Carboxylgruppe und der ersten folgenden Doppelbindung. Die Zahl der C-Atome zwischen dem Methylenende der Fettsäure und der letzten Doppelbindung (Omega-C-Atome) bleibt dadurch unverändert, so daß aus der Linolsäure 10 (18:2 n6) im Lipidstoffwechsel nur Omega-6-Fettsäuren (w6-Familie) und aus der α -Linolensäure nur Omega-3-Fettsäuren (w3-Familie) abgeleitet werden können. Der Biosyntheseweg der w6-Familie verläuft somit ausgehend von der Linolsäure (C18-2 n6) über die Gamma-Linolensäure (C18-3 n6), die Di-Homo-Gamma- 15 Linolensäure (C20-3 n6), die Arachidonsäure (C20-4 n6) zur Docosapentaensäure (C22-5 n6). Hinsichtlich der w3-Familie verläuft der Biosyntheseweg ausgehend von der α -Linolensäure (C18-3 n3), über die Octadecatetraensäure (C18-4 n3), die Eicosatetraensäure (C20-4 n3), die Eicosapentaensäure (C20-5 n3) 20 zur Docosahexanensäure (C22-6 n3).

Diese Gruppe von physiologisch außerordentlich bedeutsamen Fettsäuren wird entsprechend internationaler Konvention auch als LCP ("long-chain polyunsaturated fatty acids") bezeichnet. Diese Fettsäuren mit 20 bis 22 C-Atomen leiten sich von den 25 essentiellen C18-Fettsäuren ab und besitzen mindestens zwei Doppelbindungen im Acylrest. Die Bezeichnung LCP wird nachstehend als Kurzschreibweise dieser Gruppe von Fettsäuren benutzt, wobei zwischen den w6- und w3-LCP unterschieden wird.

Die LCP's verfügen über vielfältige biologische Wirkungen. Sie 30 sind beispielsweise unverzichtbarer Bestandteil aller Zellmembranen des Körpers. Eine Änderung der Membranlipidzusammensetzung kann zu den verschiedensten physiologischen Störungen führen.

Besondere Aufmerksamkeit haben zudem in den letzten Jahren die 35 aus einigen LCP's im Organismus synthetisierten Eicosanoide

(Prostaglandine, Leucotriene, Prostacycline und Thromboxane) erfahren. Es hat sich gezeigt, daß diese hochwirksame Substanzgruppe der Eicosanoide in niedrigen Konzentrationen an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt ist.

- 5 Bei Säuglingen und Kindern besteht nun im Vergleich von Erwachsenen wegen des relativ hohen Bedarfs für das Wachstum und der geringen Reserven die Gefahr eines Mangels an diesen LCP. Während des letzten Trimesters der intrauterinen Entwicklung des Fötus und während der postnatalen Entwicklung des Neugeborenen werden große Mengen der w6- und w3-LCP in den Organen accumuliert. Die Kapazität zur Synthese der LCP aus den essentiellen Vorstufen scheint beim jungen Säugling jedoch aufgrund einer Unreife des desaturierenden Enzymsystems limitiert zu sein.
- 15 Da diese LCP-Fettsäuren in den bisher erhältlichen Säuglingsnahrungen nahezu vollständig fehlen, wurden in letzter Zeit Formelnahrungen entwickelt, die mit diesen Fettsäuren angereichert sind, man vergleiche beispielsweise DE 39 20 679 A1.
- 20 Aufgrund des gestiegenen Interesses an LCP's wurde verstärkt nach Rohstoffquellen für derartige langkettig-hochungesättigte Fettsäuren gesucht. Die zur Zeit erhältlichen Öle aus LCP's werden ganz überwiegend aus marinen Kaltwasserfischen gewonnen (man vergleiche EP 0 292 846 A2 und DE 39 40 239 A1). Derartige Öle aus dem Muskelgewebe oder aus Organen von Fischen zeichnen sich durch hohe Anteile an w3-LCP's und insbesondere an Eicosapentaensäure (20-5 n3) und Docosahexanensäure (22-6 n3) aus. Derartige Öle und insbesondere Öle aus Fischorganen haben jedoch den Nachteil, daß sie einen hohen Cholesteringehalt besitzen und auch einen hohen Gehalt an fettlöslichen Vitaminen und ggf. an fettlöslichen Schadstoffen (Schwermetalle/Pesticide) aufweisen.

Es wurde auch bereits vorgeschlagen, LCP aus autotroph bzw. heterotroph fermentierten Microorganismen zu gewinnen (man vergleiche WO 91/07498, WO 91/119 182 und DE 34 46 795 A1).

Die hier interessierenden LCP können außerdem aus Organfetten von Schlachttieren (Rinder/Schweine und aus dem Eigelb von Hühnereiern (EP 0 074 251 B2) gewonnen werden. Die Extraktion von LCP aus Humanplacenten ist in der EP 0 140 805 A1 beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Gewinnung von LCP-reichen Lipiden aus einem bisher noch nicht für diese Zwecke eingesetzten Rohmaterial bereitzustellen. Ferner ist es Aufgabe der Erfindung, einen Lipidextrakt bzw. Lipidextraktfraktionen bereitzustellen, die reich an LCP-Fettsäuren sind und u.a. eine Grundlage zur Herstellung von Nahrungen, insbesondere Babynahrungen darstellen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Lehre der Ansprüche.

Ein wesentlicher Aspekt der Erfindung besteht darin, daß man ein bestimmtes Rohmaterial zur Gewinnung von LCP-haltigen Lipiden einsetzt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren kann man beispielsweise hauptsächlich im Meer vorkommende Makroalgen aus den Familien der Braun-, Rot- und Grünalgen zur Anwendung bringen. Von diesen sind insbesondere diejenigen aus den Familien der Phaeophyceen und Rhodophyceen von Interesse. Einzelne Arten werden vor allem in den Küstenländern Nordeuropas und Ostasiens (Japan) aber auch in anderen Teilen der Welt für die menschliche Ernährung genutzt. Diese Makroalgen sind in vielen Schelfgebieten der Ozeane zu finden und stehen in praktisch unbegrenzter Menge zur Verfügung. Einige wenige Makroalgenarten werden zudem auch in abgegrenzten Meeresarealen (Aquakulturen) gezielt kultiviert.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß man Lipide mit einem hohen Anteil an LCP's aus diesen Markoalgen in wirtschaftli

cher Weise extrahieren kann, wenn man ein organisches Lösungsmittel oder ein verdichtetes Gas einsetzt. Zudem werden die Makroalgen vor der eigentlichen Extraktion zerkleinert, insbesondere gemahlen, so daß das aus diesen Makroalgen gewonnene, 5 im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Rohmaterial eine Korngröße \leq 50 mm besitzt. Außerdem werden die Makroalgen entweder vor oder nach der Zerkleinerung getrocknet, so daß ihr Wassergehalt \leq 50 Gew.-% beträgt.

Als Rohmaterial auf Basis von Braun- und Rotalgen kann man 10 auch am Markt verfügbare, teilweise getrocknete Produkte aus zermahlenen nativen Algen ("Algenmehl") einsetzen. Diese kommerziell erhältlichen Produkte werden preisgünstig am Markt angeboten und bisher lediglich zur Bodenverbesserung oder auch als Zusatz zum Tierfutter eingesetzt.

15 Aus verschiedenen Braun- und Rotalgenarten werden derzeit in größerem Umfang Alginate und Carragenane gewonnen, die als Hydrokolloide im Bereich der Lebensmittelindustrie in vielfältiger Weise Anwendung finden. Zur Gewinnung der Hydrokolloide werden die Algen in großem Umfang wie oben beschrieben 20 "angebaut" bzw. kultiviert, geerntet, getrocknet und zermahlen. In Abhängigkeit von den gewünschten Eigenschaften der zu extrahierenden Hydrokolloide werden gezielt verschiedene Algenspezies gemischt und schließlich wässrig extrahiert.

Es wurde nun ferner überraschend gefunden, daß die bei der Hydrokolloidextraktion anfallenden Reststoffe, die zur Zeit 25 überhaupt nicht bzw. in sehr geringem Umfange zur Herstellung von Produkten zur Bodenverbesserung oder als Zusätze für Tierfutter genutzt werden, als Rohmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren einsetzen kann. Es hat sich nämlich gezeigt, 30 daß bei der Extraktion zur Gewinnung der Hydrokolloide unter Verwendung von Säuren und Laugen die in den Algen vorhandenen LCP-haltigen Lipide nicht geschädigt werden. Durch die Entfernung der Hydrokolloide aus den Algengemischen kommt es im Gegen teil sogar zu einer verbesserten Ausbeute der extrahierbaren Lipide einschließlich der hier interessierenden langket 35

tig-hochungesättigten Fettsäuren und zugleich zu einer geringeren Belastung der Extrakte mit Hydrokolloiden und Pigmenten.

Bei dem erfindungsgemäß bevorzugten Einsatz von derartigen bei der Hydrokolloidgewinnung anfallenden Reststoffen wird somit 5 ein für die menschliche Ernährung eingesetzter Rohstoff noch einmal verwendet und somit optimiert genutzt. Die Reihenfolge der Extraktionsprozesse (Extraktion mit einem wässrigen und organischen Lösungsmittel) ist im Prinzip nicht von Bedeutung. Allerdings wird eine vorherige Alginatgewinnung bevorzugt, da 10 in Folge dessen der relative Lipidgehalt im Rohstoff und damit die Ausbeute gesteigert werden kann und die Belastung der Lipidextrakte mit Hydrokolloiden minimiert wird.

Als Rohmaterial, das im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt wird, können erfindungsgemäß ferner Mikroalgen eingesetzt werden, die zum Teil in einigen Ländern bereits traditionell zur 15 menschlichen Ernährung benutzt werden. Diese überwiegend einzelligen, im Süß-, See- oder auch Brackwasser beheimateten Algen werden hierzu häufig in offenen Freilandteichen unter Ausnutzung des Sonnenlichtes kultiviert.

20 In den letzten Jahren wurde verstärkt versucht, einzellige Algen unter definierten Kulturbedingungen zu fermentieren. Entsprechend fermentativ hergestellte Algenbiomasse ist heute z.B. bereits für die Arten der Gattung *Spirulina*, *Dunaliella* und *Porphyridium* am Markt erhältlich. Zusätzlich zu diesen autotroph - d.h. unter Sonnenlicht oder künstlicher Beleuchtung - kultivierten Arten wurden Verfahren entwickelt, bestimmte Mikroalgen-Biomasse heterotroph in geschlossenen Fermentern kostengünstig herzustellen. Alle diese im Freiland kultivierten oder autotroph bzw. heterotroph fermentierten Mikroalgen 25 aus den Stämmen der *Cyanophyta*, *Chrysophyta* *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta* und *Chlorophyta* können erfindungsgemäß eingesetzt werden.

Sollten die erfindungsgemäß eingesetzten Reststoffe aus der Hydrokolloidextraktion und die erfindungsgemäß eingesetzten 35 Mikroalgen einen Feuchtigkeitsgehalt von mehr als 50 Gew.-%

und/oder eine Korngröße von größer als 50 mm besitzen, dann wird dieses Rohmaterial vor der erfindungsgemäßen Extraktion getrocknet und/oder gemahlen, so daß der Wassergehalt der im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Biomasse \leq 50 Gew.-% und die Korngröße \leq 50 mm sind.

Vorzugsweise setzt man ein Rohmaterial mit einem Wassergehalt von 5 bis 50 Gew.-%, insbesondere 5 bis 15 Gew.-% und mit einer Korngröße von 0,01 bis 50 mm, insbesondere von 0,1 bis 1,0 mm ein.

10 Als Lösungsmittel zur Extraktion der Lipide mit einem hohen Anteil an LCP's setzt man ein organisches Lösungsmittel oder ein verdichtetes Gas ein. Als organische Lösungsmittel kommen insbesondere klassische organische Solventien und niedere Alkohole mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen zur Anwendung. Vorzugsweise setzt man dabei solche Solventien und Alkohole ein, die mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar sind. Als bevorzugter Vertreter sei Ethanol genannt. Natürlich können auch Gemische der genannten Lösungsmittel eingesetzt werden. Dabei werden vorzugsweise solche organischen Lösungsmittel zur Anwendung gebracht, die nach den jeweiligen lebensmittelrechtlichen Bestimmungen zulässig sind.

Als verdichtete Gase setzt man vorzugsweise Kohlendioxid oder Propan oder ein Gemisch davon ein. Das eingesetzte Gas muß Drücke und Temperaturen aufweisen, die gewährleisten, daß es sich in einem flüssigen oder überkritischen Zustand befindet. Derartige verdichtete Gase sind durch charakteristische Lösungseigenschaften insbesondere für lipophile Inhaltsstoffe gekennzeichnet. Dem komprimierten Gas können zur Änderung der Extraktionseigenschaften andere Gase oder Flüssigkeiten als Schleppmittel in einer solchen Menge beigemischt werden, daß sich die Mischung bei den Extraktionsbedingungen in einem einheitlichen flüssigen oder überkritischen Zustand befindet. Als Schleppmittel kann dabei ein verdichtetes Gas, das polarer oder unpolarer ist als das zur Extraktion eingesetzte verdichtete Gas oder auch ein organisches Lösungsmittel Anwendung finden. Auf diese Weise kann man die Polarität des Extraktions-

onsmittels und somit die Lösungseigenschaften davon beeinflussen bzw. einstellen

Die Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel führt man insbesondere bei einer Temperatur von 20 °C bis 65 °C durch, 5 wobei der obere Temperaturwert natürlich von dem eingesetzten Lösungsmittel abhängt. Vorzugsweise extrahiert man bei einer Temperatur von ca. 60 °C, insbesondere wenn man Ethanol als organisches Lösungsmittel einsetzt.

Die Extraktion führt man vorzugsweise in Form einer ansatzweisen Extraktion (Mazeration), einer Perkolation, einer Dekanterextraktion oder einer Gegenstromextraktion durch. Die 10 Gesamtausbeuten bei diesen Verfahrensweisen können zwar geringer sein als bei einer Extraktion der gesamten Lipide, beispielsweise mit Hilfe der erschöpfenden Soxhlet-Extraktion. 15 Allerdings lassen sich diese Arbeitsweisen in wesentlich kürzerer Zeit und somit wirtschaftlicher durchführen.

Bei der Extraktion mit einem verdichteten Gas führt man vorzugsweise eine Perkolation durch.

Wenn im Rahmen der vorliegenden Unterlagen von einem organischen Lösungsmittel die Rede ist, das im erfindungsgemäßen 20 Verfahren eingesetzt werden kann, dann werden darunter sowohl die entsprechenden wasserfreien Lösungsmittel als auch solche Lösungsmittel verstanden, die Wasser enthalten (beispielsweise bis zu 30 Vol.-%). Somit können Standardlösungsmittel eingesetzt werden, ohne daß es erforderlich ist, diese vorher zu 25 trocknen. Jedoch kann ein hoher Wasseranteil die Ausbeute an gewünschten Lipiden nachteilig beeinflussen.

Zur Abtrennung des Lipidextraktes aus der durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gewonnenen Extraktionsflüssigkeit 30 (Miscella) erniedrigt man vorzugsweise die Temperatur der Miscella soweit, daß sich der Lipidextrakt zumindest teilweise abscheidet. Setzt man als Lösungsmittel ein in jedem Verhältnis mit Wasser mischbares Lösungsmittel, beispielsweise Ethanol oder Isopropanol ein, dann kann man den Lipidextrakt auch 35 durch Erhöhung des Wassergehaltes abtrennen, wobei diese Maß-

nahme auch mit der geschilderten Temperaturerniedrigung kombiniert werden kann. Dabei entzieht man der Miscella das organische Lösungsmittel nicht oder nur teilweise. Die Miscella wird, ggf. unter Kühlung, in einer ersten Stufe mit Wasser 5 versetzt, so daß die Lösungskapazität der Mischung bei der gewählten Temperatur nicht mehr ausreicht, die Lipide in Lösung zu halten. Diese werden nun beispielsweise mit einem Trennseparatator von der Miscella abgetrennt.

Der dabei resultierenden Lösung kann man nun bei Normaldruck 10 und hohen Temperaturen das flüssige Lösungsmittel entziehen und so den Restextrakt gewinnen.

Bei dieser Abtrennung des Lipidextraktes aus der Miscella durch Erhöhung des Wassergehaltes und/oder durch Temperaturerniedrigung erhöht man den Wassergehalt der Miscella vorzugsweise auf 20 % bis 90 %, insbesondere auf 30 bis 50 %. Die Temperatur der Miscella senkt man vorzugsweise auf Werte von +20 °C bis -60 °C und insbesondere auf +5 °C bis -18 °C ab. Es versteht sich von selbst, daß der Wassergehalt des ursprünglich eingesetzten Lösungsmittels und somit der Miscella vor 20 der Wasserzugabe oberhalb der angegebenen Werte gelegen hat. Vorzugsweise setzt man ein Lösungsmittel mit einem Wassergehalt von 0 bis 20 Vol.-%, insbesondere von 4-15 Vol.-% (z.B. Ethanol).

Analoges gilt für die Temperatur. So muß die Temperatur der 25 Miscella vor der Temperaturerniedrigung natürlich oberhalb derjenigen Werte liegen, auf die abgesenkt wird. Vorzugsweise hat die Miscella eine Temperatur von 40 °C bis zur Siedetemperatur des eingesetzten Lösungsmittels.

Natürlich kann man den Gesamtextrakt aus der Miscella auch 30 durch Abdampfen des Lösungsmittels gewinnen. Durch Erhöhung des Wassergehaltes und/oder durch Temperaturerniedrigung ist es jedoch möglich, die Lipide mit den hier interessierenden Fettsäuren nahezu quantitativ abzuscheiden.

Aus der mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels gewonnenen 35 Miscella oder aus dem daraus erhaltenen, vollständig oder

teilweise vom Lösungsmittel befreiten Extrakt kann man mit einem verdichteten Gas, vorzugsweise Kohlendioxid, nochmals extrahieren. Bei dieser bevorzugten Ausführungsform fraktionierte man den mit Hilfe des organischen Lösungsmittels gewonnenen Extrakt in eine unpolare triglyceridhaltige Fraktion und eine polare phospholipidhaltige Fraktion, die, ggf. nach entsprechender Raffination, vielfältigen Verwendungszwecken zugeführt werden kann.

Die Bedingungen für die fraktionierende Extraktion mit dem verdichtenden Gas sind die gleichen wie bei der Extraktion der 10 ursprünglich eingesetzten Algen etc. mit diesem Gas.

Es wurde überraschend gefunden, daß es möglich ist, durch Wahl bestimmter Rohmaterialien und durch bestimmte Extraktions- 15 schritte einen Lipidextrakt bzw. Lipidextraktfraktionen mit Lipiden zu erhalten, die reich an bestimmten LCP's sind. Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein Lipidextrakt bzw. eine Lipidextraktfraktion mit einem Gehalt an Arachidonsäure von mindestens 5 Gew.-% und/oder mit einem Gehalt an Docosahexaensäure von mindestens 3 Gew.-%, bezogen auf das Gesamt- 20 gewicht der Fettsäuren. Es versteht sich von selbst, daß diese Fettsäuren nicht frei, sondern in "gebundener Form" (z.B. Triglycerid, Glycolipid, Phospholipid etc.) vorliegen. Durch die Bereitstellung dieses Lipidextraktes bzw. dieser Lipidextraktfraktionen ist es u.a. möglich, einen Rohstoff für 25 die Herstellung von Babynahrungen bereitzustellen, der die für die Entwicklung des Kindes wichtigen Arachidonsäure und/oder Docosahexaensäure enthält. Lipide, die an diesen Fettsäuren reich sind, sind ansonsten nur schwierig oder in wirtschaftlicher Hinsicht unbefriedigender Weise zu erhalten. Der Gehalt 30 an Arachidonsäure und Docosahexaensäure und insbesondere der Gehalt an diesen beiden Fettsäuren in einem Lipidextrakt hängt natürlich von der Wahl des eingesetzten Rohmaterials ab. Es ist jedoch ausreichend, wenn der Lipidextrakt eine dieser Fettsäuren in einem hohen Anteil enthält, da er natürlich mit

anderen Extrakten und auch anderen Bestandteilen vermischt werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlicher Lipidextrakt bzw. eine Lipidex-
5 traktfraktion.

Die erfindungsgemäßen LCP-haltigen Lipidextrakte oder einzelne Lipidfraktionen (Triglyceride, Glxcolipide, Phospholipide etc. oder Gemische von beiden) können, ggf. nach üblicher Rafination und Stabilisierung, als Zusatz zum Fettkörper von Säug-
10 lingsnahrungen benutzt werden. Hierbei sind unter Säuglingsnahrungen nicht nur die üblichen Anfangsmilchnahrungen für früh- und reifgeborene Säuglinge zu verstehen, sondern auch Spezialprodukte, die beispielsweise zur Therapie oder Prävention atopischer Erkrankungen angeboten werden.

15 Aufgrund der charakteristischen Anteile an LCP und ihrer emulgierenden Eigenschaften können insbesondere phospholipidhaltige Fraktionen aus Algen-Rohstoffen nach entsprechender Rafination und Stabilisierung auch als Zusatz in FettEmulsionen zur parenteralen Ernährung benutzt werden.

20 Die genannten Lipidextrakte und/oder Lipidfraktionen und/oder die daraus nach Hydrolyse und Umesterung erhaltenen Alkylester der LCP können in geeigneter Form (beispielsweise Gelatine-Kapseln) zur Prävention arteriosklerotischer Erkrankungen und von entzündlichen Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.

25 Die LCP-haltigen Fraktionen und insbesondere die Phospholipidfraktionen können als Wirkstoffzusatz zu kosmetischen Präparaten oder als Ausgangsmaterial zur Bildung von Liposomen dienen, die ebenfalls kosmetischen Präparaten zugesetzt werden können.

30 Insbesondere die LCP-haltigen Phospholipidfraktionen können aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften als Emulgato-

ren in der Lebensmittel- und der kosmetischen Industrie eingesetzt werden.

Hochgereinigte Fraktionen der LCP-haltigen Lipide sowie die nach Hydrolyse und eventueller Umesterung erhaltenen freien

5 Fettsäuren und Fettsäureester können als Vergleichssubstanzen (Standards) in der Analytik Anwendung finden.

Beispiel 1

Extraktion verschiedener Rohmaterialien mit Hilfe der Soxhlet-Extraktion

10 Eine Reihe verschiedener Algenarten sowie eine Vielzahl verschiedener Reststoffe der Alginat- und Carragenangewinnung wurden mit Hilfe der erschöpfenden Soxhlet-Extraktion unter Verwendung von Ethanol (96 %; V/V) während eines Zeitraumes von 40 h extrahiert. Dabei wurden die Lipide quantitativ
15 extrahiert. Als gesamte Lipide werden im folgenden die natürlichen Gemische aus Triglyceriden, Glyco- und Phospholipiden sowie fettlöslichen Pigmenten und Vitaminen bezeichnet.

Die Ergebnisse dieser Extraktionen sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt. Diese Tabellen zeigen das jeweilige Fettsäuremuster bzw. die jeweiligen Gesamtlipid- bzw. Fettsäureaus-

20 beuten.

Die in diesen Tabellen 1 und 2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß die erfindungsgemäß extrahierten Braun- und Rotalgen bzw. die Reststoffe der Alginat- und Carragenangewinnung einen hohen Gehalt an physiologisch-bedeutsamen polyungesättigten Fettsäuren aufweisen. Als wertgebende Komponenten sind hier in erster Linie die Arachidonsäure (AA; 20-4 n6) und die Docosahexaensäure (DHA; 22-6 n3) zu nennen. Diese Fettsäuren können in sehr unterschiedlichen Anteilen aus den einzelnen Rohstoffen
25 extrahiert werden. Während die Arachidonsäure mit Anteilen von 5 bis 8 Gew.-% aus allen Rohstoffen extrahiert werden konnte, sind vor allem die als Alginat 3 und 4 bezeichneten Rohstoffe
30

der Alginat- und Carraghenangewinnung durch charakteristische Gehalte an Docosahexaensäure gekennzeichnet. Diese Fettsäure kommt in den übrigen Rohstoffen nicht oder in nur sehr geringen Anteilen vor.

5 Die in Tabelle 2 dargestellten Extraktionsausbeuten zeigen, daß sich der insgesamt extrahierbare Lipidgehalt der verschiedenen Algen-Rohstoffe etwa zwischen 10 bis 70 g pro kg Trockenmasse bewegt, woraus sich jeweils etwa 50 % an Gesamt fettsäuren gewinnen lassen. In den Reststoffen der Alginatgewinnung 10 beträgt der Anteil der extrahierbaren wertgegebenen Fettsäuren ($n_6\text{-LCP}+n_3\text{-LCP}$) bis zu 7 g pro kg Trockensubstanz und in den nativen Algen bis zu 6 g pro kg Trockensubstanz.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere dann wirtschaftlich durchführbar, wenn man als Rohmaterial beim erfindungsgemäßen Verfahren die beiden Reststoffe der Alginatgewinnung Alginat 2 und Alginat 3, das Single-Cell Oil (Mikroalge) 15 und das Algenmehl von *Ascophyllum nodosum* einsetzt.

Der durch die Lösungsmittlextraktion erhaltene Extrakt kann mittels herkömmlicher Verfahren fraktioniert und gereinigt 20 werden. Es kann sich auch eine erfindungsgemäße Extraktion mit einem verdichteten Gas anschließen.

Tabelle 1

Fettsäuremuster von Mikroalgen, Makroalgen und von Reststoffen
der Alginatgewinnung durch Ehtanol-Soxhlet-Extraktion in Gew.-
% des Gesamtfettsäuremusters

5	Name	Mikro	Alginat1	Alginat2	Alginat3	Alginat4	Fucus	Asco.	Lam.	Macro.
	12-0	0.50	0.78	0.84	0.20	1.06	0.08	0.15	0.51	0.32
	14-0	0.49	9.57	6.94	10.04	6.16	11.76	10.40	7.06	13.90
	t14-1 n5	0.06	0.27	0.25	0.27	0.15	0.08	0.08	0.24	0.15
	14-1 n5	0.00	0.11	0.09	0.23	1.66	0.09	0.12	0.05	0.82
	15-0	0.42	0.51	0.30	0.41	0.55	0.39	0.33	0.43	0.74
	16-0	49.66	23.53	17.39	13.40	27.92	19.27	12.40	22.39	29.90
	t16-1 n7	3.97	0.25	0.21	0.19	1.33	0.12	0.12	0.00	2.55
	16-1 n7	0.45	3.08	3.00	1.45	3.46	1.49	1.28	4.05	3.16
	17-0	0.39	0.16	0.11	0.18	0.25	0.15	0.17	0.14	0.23
10	18-0	2.97	0.97	0.63	0.66	1.80	0.82	0.93	1.11	1.51
	t18-1 n9	0.06	0.03	0.03	0.00	0.23	0.00	0.02	0.02	0.14
	18-1 n9	1.30	29.34	22.64	44.34	22.92	36.33	43.80	20.01	22.40
	18-2 n6	6.94	7.37	6.15	7.44	3.32	8.74	8.00	5.83	3.87
	18-3 n3	0.78	3.40	5.69	1.74	0.78	2.64	2.30	6.00	2.00
	18-4 n3	0.00	3.31	11.27	1.00	1.40	2.15	1.43	9.92	2.03
	20-0	0.00	0.75	0.43	0.32	2.00	0.43	0.29	0.49	1.13
	20-1 n9	0.00	0.04	0.05	0.09	0.80	0.05	0.11	0.02	0.04
	20-2 n6	1.09	0.29	0.51	1.25	0.15	0.22	1.37	0.14	0.04
	20-3 n6	0.98	0.45	0.41	0.58	0.48	0.76	0.59	0.30	0.33
	20-4 n6	12.06	7.20	8.41	5.22	5.01	7.34	8.05	7.72	7.85
15	20-3 n3	0.00	0.08	0.16	0.03	0.02	0.06	0.27	0.14	0.03
	20-5 n3	8.19	5.54	10.62	1.87	1.18	3.15	3.06	9.82	2.41
	22-0	0.00	0.08	0.04	0.15	0.03	0.15	0.12	0.02	0.09
	22-1 n9	0.00	0.01	0.01	0.14	0.68	0.02	0.30	0.37	0.04
	24-0	0.00	0.09	0.11	0.21	0.00	0.14	0.20	0.05	0.20
	24-1 n9	0.00	0.55	0.35	1.70	0.01	0.89	1.19	0.02	0.11
	22-6 n3	0.00	0.03	0.00	3.56	7.40	0.17	0.08	0.10	0.05
	n. i.		9.69	3.38	3.34	9.24	2.50	2.74	3.05	3.85
	trans FS	4.63	0.55	0.49	0.46	1.72	0.2	0.22	0.26	2.84
	Summe	100	100	100	100	100	100	100	100	100

20

Mikro = Mikroalge; z.B. *Prophyridium cruentum*; Alginat 1 bis 4 = verschiedene Reststoffe der Alginatgewinnung; Fucus = *Fucus serratus*; Asco. = *Ascophyllum nodosum*; Lam. = *Laminaria digitata*, Macro. = *Macrocystis pyrifera*; n.i. = nicht identifiziert; trans FS = trans Fettsäuren.

Tabelle 2

Gesamtextrakt-, Lipidextrakt- und Fettsäureausbeuten von Mikroalgen, Makroalgen und von Reststoffen der Alginatgewinnung durch Ethanol-Soxhlet-Extraktion in g pro kg Rohstoff-Trocken-

5 substanz

	Mikro	Alginat1	Alginat2	Alginat3	Alginat4	Lam.	Macro.	Fucus	Asco.
GE	233,7	77,22	98,25	111,32	52,28	130,64	61,68	246,92	157,05
LE	20,7	55,60	73,51	60,36	22,16	22,45	11,25	46,15	73,74
Ges.-FS	10,1	28,07	34,81	34,00	7,54	9,78	5,11	27,26	42,19
% FS im LE	48,3	50,49	47,36	56,33	37,48	43,59	45,40	59,07	57,20
n6-LCP	14,14	2,28	3,36	2,48	0,47	0,82	0,44	2,33	4,34
n3-LCP	8,19	1,62	3,88	1,92	0,71	1,02	0,13	0,95	1,48
20-4 n6	2,49	2,07	3,03	1,84	0,42	0,78	0,42	2,05	3,49
20-5 n3	1,69	1,59	3,83	0,66	0,10	0,99	0,13	0,88	1,33
22-6 n3	0,00	0,01	0,00	1,25	0,61	0,01	0,00	0,05	0,03

10

15 Mikro = Mikroalge; z.B. *Porphyridium cruentum*; Alginat 1 bis 4 = verschiedene Reststoffe der Alginatgewinnung; Lam. = *Laminaria digitata*, Macro. = *Macrocystis pyrifera*, Fucus = *Fucus serratus*; Asco. = *Ascophyllum nodosum*; GE = Gesamtextrakt; LE = Lipidextrakt nach Entfernen der hydrophilen Best andteile

20 ("FOLCH"); Ges.-FS = Gesamt-Fettsäuren; n6-LCP = Summe der n6 Fettsäuren mit 20 und mehr Kohlenstoffatomen im Acylrest; n3-LCP = Summe der n3 Fettsäuren mit 20 und mehr Kohlenstoffatomen im Acylrest; 20-4 n6 = Arachidonsäure; 20-5 n3 = Eicosapentaensäure, 22-6 n3 = Docosahexaensäure.

25 Der Extrakt wird vorzugsweise durch Destillation unter vermindertem Druck vollständig vom Lösungsmittel befreit und dann den bei der Gewinnung von Speisefetten industriell üblichen Reinigungsverfahren, wie Bleichung, Entschleimung und Desodo

rierung, unterzogen. Das Bleichmittel kann bereits vor dem vollständigen Entfernen des Lösungsmittels zugegeben werden.

Beispiel 2:

Extraktion von Lipiden aus der Alge Ascophyllum nodosum mit

5 90 %igem Ethanol

Als Rohstoff eingesetzt wurde das Mehl der Alge *Ascophyllum nodosum*.

Charakterisierung des Rohstoffes *Ascophyllum nodosum*:

Wassergehalt: 9,6 %

10	Korngröße <u>Siebmaschenweite</u>	% Verteilung
	[mm]	
	0,5	0,2
	0,25	0,4
15	0,1	75,4
	0,05	23,1
	>0,05	0,9

Die Lösungsmittel-Extraktion über 4 h wurde mit Ethanol (90 %; Vol/Vol) bei verschiedenen Temperaturen vorgenommen. Bei der 20 verwendeten Anordnung handelt es sich um eine im Labormaßstab nachempfundene einstufige Perkolation. Das Verhältnis zwischen eingesetztem Extraktionsmittel und der Rohstoff-Trockensubstanz betrug etwa 4:1 (Gew./Gew.).

Im Vergleich zur Soxhletextraktion (vgl. Tab. 3), bei der eine 25 Extraktionszeit von 40 h eingehalten wurde, lagen die Ausbeuten der 4-stündigen Perkolation durchweg relativ hoch. Es zeigte sich, daß eine Erhöhung der Extraktionstemperatur zu einer verbesserten Ausbeute bei allen Extraktinhaltstoffen führt. Eine weitergehende Optimierung der Ausbeute bei der 30 Extraktion dieses Rohstoffes ist durch eine weitere Erhöhung des Verhältnisses zwischen Lösungsmittel und Rohstoff oder durch eine Änderung der Prozessführung hin zu einer Gegenstromextraktion erreichbar (vgl. Beispiel 3).

Tabelle 3

Extraktionsausbeuten bei der Perkolation in % bezüglich Rohstoff-Trockensubstanz

Temp. (°C)	20	30	40	50	60	Soxhlet
5						
GE (%)	8,06	11,01	14,34	16,54	17,89	15,7
FS (%)	0,93	1,18	1,25	1,34	1,41	4,22
20-4 n6 (%)	0,09	0,11	0,12	0,13	0,14	0,35
20-5 n3 (%)	0,05	0,06	0,06	0,07	0,08	0,13
10 Beladung (%)	2,5	2,3	3,1	3,4	3,7	

GE = Gesamtextrakt; FS = Fettsäureausbeute; 20-4 n6 = Ausbeute an Arachidonsäure; 20-5 n3 = Ausbeute an Eicosapentaensäure

Die in Tab. 3 dargestellten Ergebnisse des einstufigen Perkolationsversuches zeigen, daß mit dieser Versuchsanordnung Ausbeuten von 41 % der Arachidonsäureanteile und 58,5 % der Eicosapentaensäureanteile im Vergleich zur Soxhlet-Extraktion erzielt werden. Mit dem Perkolationsverfahren konnten insgesamt 33,4 % der maximal extrahierbaren Fettsäuren gewonnen werden. Der im Vergleich zur Soxhlet-Extraktion erhöhte Wert für die Gesamtextraktionsausbeute ist auf den höheren Wassergehalt (10 %) des bei der Perkolation verwendeten Ethanol und die daraus resultierende intensivere Extraktion hydrophiler Substanzen zurückzuführen.

Aus Tabelle 3 wird zudem ersichtlich, daß zur Extraktion des Mehles der Alge *Ascophyllum nodosum* mit 90 %igem Ethanol eine Extraktionstemperatur von ca. 60 °C anzustreben ist, wenn das Verfahren hinsichtlich der Miscellabeladung, d.h. des Lösungsmittelverbrauches optimiert werden soll. Selbstverständlich sind vergleichbare Ausbeuten auch bei niedrigeren Temperaturen und entsprechend höherem Lösungsmittelleinsatz erreichbar.

Beispiel 3

Stufenweise Gegenstromextraktion eines Reststoffes der Alginatgewinnung mit 90 % Ethanol

Bei diesem Beispiel wurde ein Rohstoff verwendet, der bereits

zur Gewinnung von Alginat eingesetzt wurde (Alginat 1). Bei diesem Reststoff handelt es sich um ein Gemisch verschiedener Braunalgen-Arten. Die Algenreststoffe wurden nach dem Alginategewinnungsprozeß getrocknet und gemahlen, so daß sie in Korngröße und Wassergehalt in etwa dem Mehl der Alge *Ascophyllum nodosum* (siehe Beispiel 2) entsprechen.

Die angewandte Extraktionsmethode der stufenweisen Gegenstromextraktion entspricht den in technischem Maßstab durchgeführten Verfahren. Im Gegensatz zur Perkolation (Beispiel 1) schwankt die Extraktbeladung der Miscella bei der mehrstufigen Gegenstromextraktion um einen Mittelwert. Je mehr Stufen eingesetzt werden und je kürzer die Verweildauer des Rohstoffes in der Anordnung ist, um so geringer ist diese Schwankung. Mit diesem Verfahren können im Vergleich zur Perkolation identische Ausbeuten mit einem Bruchteil des Lösungsmittelaufwandes bzw. mit ähnlichen Lösungsmittelmengen höhere Ausbeuten erzielt werden.

In dem gewählten Beispiel wurde eine 4-stufige Versuchsanordnung gewählt. Die Extraktionstemperatur betrug 20 °C; das Verhältnis zwischen eingesetzter Extraktionsmittelmenge und Rohstoff-Trockensubstanz lag bei 2:1.

Trotz der vergleichsweise einfachen Anordnung (bei industriell betriebenen Anlagen sind 30 und mehr Stufen nicht unüblich), konnten in diesem Beispiel Ausbeuten von 66 % der Arachidonsäure, 72,5 % der Eicosapentaensäure und 45,7 % der Gesamtfettsäuren im Vergleich zur Soxhlet-Extraktion erreicht werden.

Tabelle 4

Ausbeuten der mehrstufigen Gegenstromextraktion von Alginat 1 im Vergleich zur Soxhlet-Extraktion in Gew.-% bezüglich Rohstoff-Trockensubstanz

	<u>Ausbeute</u>	<u>Gegenstromextraktion</u>	<u>Soxhlet-Extraktion</u>
5	Gesamtextrakt	5,92	7,72
	Gesamtlipidextrakt	4,24	5,56
	Gesamtfettsäuren	1,28	2,80
	Arachidonsäure (20-4 n6)	0,13	0,20
10	Eicosapentaensäure (20-5 n3)	0,12	0,16

Vergleicht man diese Werte mit den Ergebnissen der Perkolation von Beispiel 2, werden die Vorteile der Gegenstromextraktion deutlich. Obwohl bei der Gegenstromextraktion nur 50 % der Lösungsmittelmenge eingesetzt wurde und die Extraktionstemperatur lediglich 20 °C betrug, übersteigen die Ausbeuten bezüglich der Gesamtfettsäuren und der Arachidonsäure dennoch deutlich die der Perkolation.

Beispiel 4

Extraktion von Mehl der Alge Ascophyllum nodosum mit verdichtetem Kohlendioxid

Zur Extraktion mit verdichteten Gasen wird der getrocknete und gemahlene Rohstoff aus nativen Algen oder aus Reststoffen der Alginat- und Carraghenangewinnung verwendet. Der Wassergehalt des Ausgangsmaterials liegt üblicherweise zwischen 5 und 50 Gew.-% vorzugsweise zwischen 10 und 20 Gew.-%. Die Korngröße des Materials beträgt 0,01 mm bis 50 mm, vorzugsweise 0,1 mm bis 0,3 mm.

Als Rohstoff dient das bereits im Beispiel 2 verwendete Algenmehl von *Ascophyllum nodosum*. Die Extraktion wurde mit verdichtetem Kohlendioxid (150 bar, 35 °C, ca. 11 kg CO₂/kg Rohstoff) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind mindestens 90 % der insgesamt mit diesem Lösungsmittel extrahierbaren Lipide zu gewinnen.

Tabelle 5

Extrakt- und Fettsäureausbeuten der HD-Extraktion von Asco-phyllum nodosum im Vergleich zur Ethanol-Soxhlet-Extraktion in Gew.-% bezüglich Rohstoff-Trockensubstanz

5 Ausbeute	HD-Extraktion	Soxhlet-Extraktion
Gesamtlipidextrakt	2,50	7,30
Gesamtfettsäuren	2,10	4,20
Arachidonsäure (20-4 n6)	0,18	0,35
Eicosapentaensäure (20-5 n3)	0,08	0,13

10 HD = Hochdruck; Gew.-% = Gewichtsprozent

In Tabelle 5 werden die mit der jeweils bezeichneten Methode bezüglich des genannten Rohstoffes maximal erreichbaren Ausbeuten gegenübergestellt. Die Soxhlet-Extraktion steht hierbei für Verfahren der Lösungsmittlextraktion mit Ethanol insgesamt, da selbst im Prinzip nichts anderes als eine wiederholte Perkolation/Mazeration darstellt.

Um die Qualität der erhaltenen Extrakte beurteilen zu können, werden in Tabelle 6 die Fettsäuremuster der nach den beiden Verfahren gewonnenen Extrakte gegenübergestellt.

Tabelle 6

Vergleich der Fettsäurespektren eines HD-Extraktes und eines Soxhlet-Extraktes von *Ascophyllum nodosum*; Angaben in Gew.-%
der Gesamtfettsäuren

Fettsäuren	HD-Extrakt	Soxhlet-Extrakt
14-0	5.58	10.4
14-1 n5	0.15	0.12
16-0	7.46	12.4
16-1 n7	0.94	1.28
18-0	0.97	0.93
18-1 n9	53.8	43.8
18-2 n6	9.56	8.0
20-0	0.34	0.29
18-3 n5	1.58	2.3
20-1 n9	0.48	0.11
20-2 n6	1.77	1.37
22-0	2.88	0.12
20-3 n6	0.91	0.59
22-1 n9	0.44	0.30
20-4 n6	7.26	8.05
20-5 n3	2.18	3.06

HD = Hochdruck; Gew.-% = Gewichtsprozente

15 Die Ergebnisse in Tabelle 6 machen deutlich, daß der Lösungsmittlextrakt aus *Ascophyllum nodosum* im Vergleich zum HD-Extrakt hinsichtlich des Anteils an Arachidon- und Eicosapentaensäure nur eine geringfügig günstigere Zusammensetzung aufweist. Da mit Hilfe der Hochdruck-Extraktion in erster Linie 20 unpolare Lipide (Triglyceride) extrahiert werden, muß davon ausgegangen werden, daß die wertgebenden Fettsäuren auch mit hohen Anteilen in diesen Lipiden vorkommen.

Beispiel 5

Abtrennung der Lipidfraktion aus der Miscella durch Erhöhung 25 des Wassergehaltes

Die Abtrennung der Lipidfraktion aus der Miscella durch Erhöhung des Wassergehaltes wurde am Beispiel der durch stufen

weise Gegenstromextraktion von Alginat 2 mit 90 %Ethanol erhaltenen Miscella durchgeführt. Es wurden 5 aliquote Teilmengen der Miscella abgenommen und diese ausgehend von den 10 % Wasser in der Ausgangsmiscella gezielt auf verschiedene Wassergehalte eingestellt (vgl. Tab. 7). Die nach Wasserzugabe abgeschiedenen Extrakte wurden durch Zentrifugieren, Abdekantieren des Überstandes und abschließendes Trocknen gewonnen.

Aus der nachstehenden Tabelle 7 wird ersichtlich, welcher Zusammenhang zwischen dem Wassergehalt der Miscella und der Ausbeute der abgeschiedenen Lipidfraktion besteht. Gegenübergestellt werden die erhaltenen Lipidausbeuten einem Vergleichsextrakt, der durch vollständiges Abdampfen des Lösungsmittels einer aliquoten Menge aus der Ausgangsmiscella gewonnen wurde. Dabei werden die Ausbeuten relativ in Prozent des Vergleichsextraktes dargestellt (Vergleichsextrakt = 100 %).

Tabelle 7

Lipidausbeuten aus der Miscella nach Abscheidung durch Erhöhung des Wassergehaltes in Prozent bezüglich des Vergleichsextraktes (= 100 %); Werte für Wassergehalt in % absolut

20

Wassergehalt	25.0	35.7	43.75	50	55
GE	46.06	78.63	84.76	87.31	88.73
LE	48.28	74.92	80.68	84.8	88.32
FS	51.59	90.07	93.24	94.61	94.7
20-4 n6	64.56	100.2	102.9	103.1	97.58
20-5 n3	57.49	97.94	102.32	104.41	95.62

25 GE = Gesamtextrakt; LE = Lipidextrakt; FS = Fettsäuren; 20-4 n6 = Arachidonsäure; 20-5 n3 = Eicosapentaensäure

Die Werte in Tabelle Nr. 7 zeigen, daß bereits eine Erhöhung des Wassergehaltes der Miscella von 10 % auf 35 % ausreicht, um die Lipide, in denen die wertgebenden Fettsäuren Arachidon- 30 und Eicosapentaensäure lokalisiert sind, nahezu quantitativ

abzuscheiden. Die Werte über 100 % resultieren vermutlich daraus, daß aufgrund der höheren Reinheit der Lipidfraktionen nach Abscheidung im Vergleich zu Vergleichsextrakt die Fettsäuren vollständiger in die gaschromatographisch bestimmmbaren 5 Derivate überführt werden können.

Das hier angewandte Verfahren der Lipidabscheidung aus der Miscella durch Erhöhung des Wassergehaltes weist zudem verschiedene verfahrenstechnische Vorzüge auf:

1. Durch die starke Erhöhung des Wassergehaltes der Miscella 10 findet eine Vorreinigung des Extraktes statt, denn hydrophile Substanzen, die bei einem Wassergehalt des Extraktionsmittels von 10 % bereits mitextrahiert wurden, bleiben in Lösung und müssen auf diese Weise nicht erst nachträglich durch aufwendige Verfahren aus dem Gesamtlipidextrakt entfernt werden.
2. Alginate oder Carraghenane, die vor allem aus den nativen Algen in z.T. recht großen Mengen durch 90 % Ethanol extrahiert werden, können bei der Lösungsmittelrückgewinnung in moderaten Verdampfersystemen /z.B. Fallstromverdampfer) zu Störungen führen. Wird der Lipidextrakt jedoch durch Zugabe von Wasser aus der Miscella gewonnen, hält der Wasserüberschuß die hydrophilen Hydrokolloide in Lösung, so daß die Abtrennung des Lösungsmittels aus der Restmicella problemlos durchgeführt werden kann.
- 25 Um überprüfen zu können, ob durch die Wasserzugabe eine selektive Abscheidung der Lipide aus der Miscella und damit eine Veränderung des Fettsäuremusters der Lipide stattfindet, wurde exemplarisch der bei einem Miscella-Wassergehalt von 55 % abgeschiedene Extrakt und der Vergleichsextrakt gaschromatographisch untersucht.

Der in der nachstehenden Tabelle 8 aufgeführte Extrakt 1 wurde durch Erhöhung des Wassergehaltes auf 55 % aus der Ausgangsmicella gewonnen, während der Vergleichsextrakt durch Abdampfen des Lösungsmittels aus der Ausgangsmicella erhalten 35 wurde.

Tabelle 8

Fettsäuremuster eines bei 55 % Wasseranteil abgeschiedenen Extraktes im Vergleich zum Gesamtextrakt; Angaben in Gew.-% der Gesamtfettsäuren

5

Fettsäuren	Ext. 1	Vergleichsextrakt
14-0	8.26	7.9
14-1 n5	0.76	0.69
16-0	19.73	18.9
16-1 n7	4.28	4.32
18-0	0.43	0.39
18-1 n9	24.56	22.46
18-2 n6	7.88	7.43
20-0	0.37	0.34
10 18-3 n3	6.97	6.77
20-1 n9	0.17	0.15
20-2 n6	0.27	0.26
20-3 n6	0.4	0.37
22-1 n9	0.08	0.07
20-4 n6	11.44	10.72
20-5 n3	10.56	10.01
22-6 n3	0.46	0.36

10

15

Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse in Tabelle 8 zeigen, daß sich die Fettsäurespektren der beiden Extrakte nicht wesentlich unterscheiden. Auch die Anteile der wertgebenden Fettsäuren Arachidon- und Eicosapentaensäure stimmen mit 10 bis 11 Gew.-% nahezu überein. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits in Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse, daß durch gezielte Wasserzugabe eine quantitative Abscheidung der Lipide und Fettsäuren aus der Roh-Miscella möglich ist.

Beispiel 6

Nachstehend ist die Abtrennung des Neutrallipidextraktes durch Extraktion mit verdichteten Gasen beschrieben.

In einer geeigneten Anlage wird die mit organischen Lösungs-
5 mitteln (vorzugsweise Ethanol) gewonnene Miscella oder ein ganz oder teilweise vom Lösungsmittel befreiter Extrakt in einem Extraktionsautoklaven in Kontakt mit verdichteten Gasen, vorzugsweise Kohlendioxid gebracht. Dem verdichteten Gas kann ein Schleppmittel zur gezielten Einstellung der Extraktionseigenschaften zudosiert werden.
10

Wurde das flüssige Lösungsmittel vollständig aus dem Extrakt entfernt, und dem Extraktionsgas kein Schleppmittel beigesetzt, werden aus dem Extrakt selektiv die Triglyceride, Carotinoide, Chlorophylle und Phytosterine herausgelöst. Durch 15 geeignete Wahl und Dosierung des Schleppmittels bzw. unvollständige Abtrennung des flüssigen Lösungsmittels aus dem Extrakt können die Lösungseigenschaften des Extraktionsgases wesentlich erweitert werden.

Durch Druckminderung und/oder Temperaturerhöhung des Extraktionsgases wird dessen Lösungskapazität stufenweise verringert. 20 In jeder dieser Stufen fällt ein bestimmter Teil der gelösten Lipide als Extraktfraktion an. Auf diese Weise erfolgt primär eine Fraktionierung der Lipide in eine unpolare und eine polare Fraktion. Die unpolare Lipidfraktion kann dann im Zuge 25 einer mehrstufigen Abscheidung einer weiteren Fraktionierung unterzogen werden.

Diese Abtrennung wird anhand einer CO₂-Hochdruck-Gegenstromextraktion einer Miscella näher erläutert.

Ein Aliquot einer Miscella, die durch eine Mazeration von Alginat 2 mit 90 % Ethanol gewonnen wurde, wird im Gegenstrom 30 mit verdichtetem Kohlendioxid (150 bar, 35 °C) in einer Abtriebssäule extrahiert. Nach der Extraktion wird das verdichtete Gas in einem Abscheideautoklaven auf 20 bar entspannt, so daß das im Fluid gelöste Lipid als Extrakt anfällt. Am Boden

der Säule sammelt sich die nicht im Fluid lösliche Fraktion. Sie besteht aus polaren Lipiden und dem nicht lipophilen Restextrakt. Der Füllstand des Abscheiders und der Abtriebssäule kann während der Extraktion über Sichtfenster visuell kontrolliert werden. Beide Fraktionen werden im Laufe der Extraktion bei Erreichen einer bestimmten Füllhöhe über ein Ventil abgenommen.

Die Mazeration wurde in diesem Beispiel als einstufige Batch-Extraktion bei 35 °C über 20 h durchgeführt. Die Miscellabeladung betrug vor Hochdruckextraktion bezüglich Gesamtextrakt 10 1,37 % und bezüglich Lipidextrakt 1 %. Von der durch die Mazeration erhaltenen Miscella wurde eine Teilmenge abgenommen und zur Hochdruckextraktion eingesetzt. Nach der Hochdruckextraktion konnten im Abscheider 41,3 % des Gesamtextraktes und 50,9 15 % des Lipidextraktes wiedergefunden werden.

Gaschromatographische Untersuchung der Extrakte im Abscheider und vor der HD-Extraktion

Um beurteilen zu können, ob sich der durch die Hochdruckextraktion erhaltene Neutrallipidextrakt infolge der Fraktionierung in der Zusammensetzung der Fettsäuren gegenüber dem Gesamtextrakt unterscheidet, wurde eine gaschromatographische Analyse des Fettsäuremusters des Extraktes vor und nach der Hochdruckextraktion durchgeführt.

Tabelle 9

Fettsäuremuster eines durch Mazeration erhaltenen Lipidextraktes aus Alginat 2 vor und nach der Hochdruck-Extraktion (HD-E) in Gew.-% der Gesamtfettsäuren

5

10

15

Fettsäuren	vor HD-E	nach HDE i.Ab.
12-0	0.36	0.51
14-0	8.25	7.65
t14-1 n5	0.07	0.00
14-1 n5	0.41	0.27
15-0	0.36	0.11
16-0	20.17	19.42
t16-1 n7	0.27	0.23
16-1 n7	3.56	3.42
17-0	0.15	0.11
18-0	1.04	0.61
t18-1 n9	0.07	0.02
18-1 n9	26.02	22.85
18-2 n6	7.10	6.18
19-0	0.00	0.00
18-3 n3	4.68	6.18
18-4 n3	9.64	12.47
20-0	0.61	0.39
20-1 n9	0.14	0.05
20-2 n6	0.49	0.42
20-3 n6	0.50	0.35
20-4 n6	7.84	7.60
20-3 n3	0.14	0.15
20-5 n3	7.68	10.37
22-0	0.05	0.07
22-1 n9	0.11	0.17
24-0	0.07	0.06
24-1 n9	0.10	0.28
22-6 n3	0.11	0.03
Summe	100	100

20

HDE = Hochdruckextraktion; Gew.-% = Gewichtsprozent; FS = Fettsäuren; n.HDE i.AB. = nach Hochdruckextraktion im Abscheider

Der Vergleich der Fettsäurespektren der Lipidextrakte vor und nach der Hochdruckextraktion zeigt, daß sich das Fettsäuremuster der Neutrallipidfraktion nicht wesentlich vom Gesamtextract unterscheidet. Der Anteil der physiologisch bedeutsamen 5 Fettsäuren Arachidonsäure (20-4 n6) und Eicosapentaensäure (20-5 n3) im Neutrallipidextract ändert sich infolge der HD-Extraktion nicht zum Negativen, sondern steigt im Gegenteil im Falle der Eicosapentaensäure sogar an.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, daß die LCP's in we-10 sentlichen Anteilen in den Neutrallipiden der Reststoffe der Alginatgewinnung lokalisiert sind.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung von Lipiden mit einem hohen Anteil von langkettig-hochungesättigten Fettsäuren (LCP) mit 20 bis 22 C-Atomen durch Extraktion aus einem Rohmaterial tierischen oder pflanzlichen Ursprungs dadurch gekennzeichnet, daß man als Rohmaterial einzellige Algen (Mikroalgen), Makroalgen aus den Familien der Braun-, Rot- und Grünalgen und/oder Reststoffen der Alginat- bzw. Carraghenan- gewinnung mit einem Wassergehalt \leq 50 Gew.-% und einer Korngröße \leq 50 mm einsetzt und daß man zur Extraktion ein organisches Lösungsmittel oder ein verdichtetes Gas verwendet.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Rohmaterial mit einem Wassergehalt von 5 bis 50 %, insbesondere 5 bis 15 Gew.-%, und mit einer Korn- größe von 0,01 bis 50 mm, insbesondere 0,1 bis 1,0 mm einsetzt.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man mit einem mit Wasser in jedem Verhältnis mischbaren Lösungsmittel, insbesondere einem niederen Alkohol, bei einer Temperatur von 20 °C bis 65 °C, insbesondere 60 °C, extrahiert und daß man die Extraktion in Form einer ansatzweisen Extraktion (Mazeration), Perkolation, Dekanterextraktion oder Gegenstromextraktion durchführt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß die mit Hilfe eines mit Wasser in jedem Verhältnis
mischbaren Lösungsmittel, insbesondere Ethanol, bei 20 °C
oder darüber gewonnene Extraktionsflüssigkeit (Miscella)
5 mit Wasser soweit verdünnt, insbesondere auf 20 bis 90
Vol.-%, und/oder soweit abkühlt, insbesondere auf < + 20
°C bis - 60 °C, daß sich der Lipidextrakt zumindest teil-
weise abscheidet, und
10 daß man den so erhaltenen Lipidextrakt abtrennt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels
gewonnene Miscella oder den daraus erhaltenen, teilweise
15 oder vollständig vom Lösungsmittel befreiten Extrakt mit
einem verdichteten Gas extrahiert und die im verdichteten
Gas gelöste, neutrale Lipidfraktion sowie gewünschten-
falls die nicht im verdichteten Gas in Lösung gegangene,
polare Lipidfraktion isoliert.
- 20 6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die angewandten Drücke der verdichteten Gase 60 bis
2000 bar, insbesondere 70 bis 500 bar, und die Temperatur
- 20 bis + 200 °C, insbesondere + 20 bis + 60 °C, betra-
25 gen.
7. Verfahren nach Anspruch 1, 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Kohlendioxid als verdichtetes Gas einsetzt, dem
ein Schleppmittel beigegeben sein kann.
- 30 8. Lipidextrakt oder Lipidextraktfraktion von einzelligen
Algen (Mikroalgen), Makroalgen aus den Familien der
Braun-, Rot- und Grünalgen und/oder den Reststoffen der
Alginat- bzw. Carragenangewinnung,
gekennzeichnet durch
35 einen Gehalt an Arachidonsäure von mindestens 5 Gew.-%

und/oder einen Gehalt an Docosahexaensäure von mindestens 3 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Fettsäuren.

9. Lipidextrakt oder Lipidextraktfraktion,
erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1
5 bis 7.
10. Lipidextrakt oder Lipidextraktfraktion nach Anspruch 9,
gekennzeichnet durch
einen Gehalt an Arachidonsäure von mindestens 5 Gew.-%
und/oder einen Gehalt an Docosahexaensäure von mindestens
10 3 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Fettsäuren.
11. Nahrungsmittel,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen Lipidextrakt oder eine Lipidextraktfraktion
nach einem der Ansprüche 8 bis 10 enthält
- 15 12. Verwendung des Lipidextraktes oder der Lipidextraktfraktion nach einem der Ansprüche 8 bis 10 als Zusatz zum
Fettkörper von Säuglingsnahrungsprodukten, als Diätetika
zur Arterioskleroseprävention, zur Prävention von Auto-
immunerkrankungen (Atopien) und als Zusatz zu kosme-
20 tischen Produkten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/01334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. ⁵ C11B1/10; C11C1/00; A23L1/337

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. ⁵ C11B; C11C; A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE, A, 3213744 (NIPPON SUISAN KAISHA CO. LTD.) 04 November 1982	8,10-12
Y	see page 6, paragraph 4; claims 1,2,4 see page 7, paragraph 2 - page 8, paragraph 3 ---	1-7
Y	EP, A, 0092085 (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.) 26 October 1983	1-7
A	see page 6, line 30 - page 8, line 19; claims 8,10,13 ---	11,12
A	EP, A, 0459744 (THE SCOTTISH AGRICULTURAL COLLEGE) 04 December 1991 see page 3; claims 2,9; figure 1 ---	1,8,11
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 009, No. 071 30 March 1985 & JP, A, 59204128 (KOUGIYOU KAIHATSU KENKYUSHO KK) 19 November 1984 see abstract ---	1,3,12 .../...

<input type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/>	See patent family annex.
•	Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September 1993 (30.09.93)	12 October 1993 (12.10.93)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE	Authorized officer
Faxsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/01334

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 011, No.232 29 July 1987 & JP,A,62045532 (NISSHIN OIL MILLS LTD) 27 February 1987 see abstract ----	1,3,12
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9043, 1990 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D, AN 90-326188 & JP, A, 2235997 (HASEGAWA KK) 18 September 1990 see abstract ----	1,3,5-7
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 7404, 1974 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D, AN 74-06196 & JP,A,47039514 (RIKEN VITAMIN OIL CO) 08 December 1972 see abstract -----	1,3,12

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9301334
SA 75683

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

30/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE-A-3213744	04-11-82	JP-A-	57169416	19-10-82
		JP-A-	57183716	12-11-82
		GB-A-	2098065	17-11-82
<hr/>		<hr/>		
EP-A-0092085	26-10-83	AU-B-	567091	12-11-87
		AU-A-	1308483	20-10-83
		AU-A-	1316983	20-10-83
		CA-A-	1195172	15-10-85
		CA-A-	1216592	13-01-87
		EP-A,B	0092076	26-10-83
		GB-A,B	2118567	02-11-83
		JP-C-	1723581	24-12-92
		JP-B-	4004298	27-01-92
		JP-A-	58189110	04-11-83
		JP-B-	1055680	27-11-89
		JP-C-	1569005	10-07-90
		JP-A-	58192828	10-11-83
		US-A-	4970235	13-11-90
		US-A-	5011855	30-04-91
		US-A-	4938984	03-07-90
		US-A-	4526793	02-07-85
		US-A-	4703060	27-10-87
<hr/>		<hr/>		
EP-A-0459744	04-12-91	None		
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Altenzeichen

PCT/EP 93/01334

I. KLASSEFAKATI N DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)⁶Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC
Int.K1. 5 C11B1/10; C11C1/00; A23L1/337

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierte Mindestpräfisstoff⁷

Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole		
Int.K1. 5	C11B ;	C11C ;	A23L

Recherchierte nicht zum Mindestpräfisstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹

Art. ¹⁰	Kenzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	DE,A,3 213 744 (NIPPON SUISAN KAISHA CO. LTD.) 4. November 1982	8,10-12
Y	siehe Seite 6, Absatz 4; Ansprüche 1,2,4 siehe Seite 7, Absatz 2 - Seite 8, Absatz 3 ---	1-7
Y	EP,A,0 092 085 (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.) 26. Oktober 1983	1-7
A	siehe Seite 6, Zeile 30 - Seite 8, Zeile 19; Ansprüche 8,10,13 ---	11,12
A	EP,A,0 459 744 (THE SCOTTISH AGRICULTURAL COLLEGE) 4. Dezember 1991 siehe Seite 3; Ansprüche 2,9; Abbildung 1 ---	1,8,11
		-/-

⁶ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:

- ^{“A”} Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- ^{“E”} älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelddatum veröffentlicht worden ist
- ^{“L”} Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- ^{“O”} Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- ^{“P”} Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelddatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- ^{“T”} Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelddatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- ^{“X”} Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- ^{“Y”} Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann maßgebend ist
- ^{“&”} Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. SEPTEMBER 1993

Absendetermin des internationalen Recherchenberichts

12. 10. 93

Internationale Recherchenbehörde

EUR PAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevoilichtigten Bediensteten

KANBIER D.T.

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kenzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 009, no. 071 30. März 1985 & JP,A,59 204 128 (KOUGIYOU KAIHATSU KENKYUSHO KK) 19. November 1984 siehe Zusammenfassung ----	1,3,12
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 011, no. 232 29. Juli 1987 & JP,A,62 045 532 (NISSHIN OIL MILLS LTD) 27. Februar 1987 siehe Zusammenfassung ----	1,3,12
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9043, 1990 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D, AN 90-326188 & JP,A,2 235 997 (HASEGAWA KK) 18. September 1990 siehe Zusammenfassung ----	1,3,5-7
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 7404, 1974 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D, AN 74-06196 & JP,A,47 039 514 (RIKEN VITAMIN OIL CO) 8. Dezember 1972 siehe Zusammenfassung -----	1,3,12

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9301334
SA 75683

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

30/09/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A-3213744	04-11-82	JP-A- 57169416 JP-A- 57183716 GB-A- 2098065	19-10-82 12-11-82 17-11-82
EP-A-0092085	26-10-83	AU-B- 567091 AU-A- 1308483 AU-A- 1316983 CA-A- 1195172 CA-A- 1216592 EP-A, B 0092076 GB-A, B 2118567 JP-C- 1723581 JP-B- 4004298 JP-A- 58189110 JP-B- 1055680 JP-C- 1569005 JP-A- 58192828 US-A- 4970235 US-A- 5011855 US-A- 4938984 US-A- 4526793 US-A- 4703060	12-11-87 20-10-83 20-10-83 15-10-85 13-01-87 26-10-83 02-11-83 24-12-92 27-01-92 04-11-83 27-11-89 10-07-90 10-11-83 13-11-90 30-04-91 03-07-90 02-07-85 27-10-87
EP-A-0459744	04-12-91	Keine	